

**AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK METANOL DAUN AFRIKA (*Vernonia amygdalina* Delile) TERHADAP SEL HeLa DAN WiDr**



**Disusun sebagai salah satu syarat menyelesaikan Program Studi Strata I pada Jurusan Farmasi  
Fakultas Farmasi**

**Oleh:**

**ARINA NISYYA NADHIRA**

**K 100 150 149**

**PROGRAM STUDI FARMASI  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA  
2019**

**HALAMAN PERSETUJUAN**

**AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK METANOL DAUN AFRIKA (*Vernonia  
amygdalina* Delile) TERHADAP SEL HeLa DAN WiDr**

**PUBLIKASI ILMIAH**

oleh:

**ARINA NISYYA NADHIRA**

**K 100 150 149**

Telah diperiksa dan disetujui untuk diuji oleh:

Dosen Pembimbing



**Ratna Yuliani, S.Si., M.Biotech.St.**

**NIK. 957**

**HALAMAN PENGESAHAN**

**AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK METANOL DAUN AFRIKA (*Vernonia amygdalina* Delile) TERHADAP SEL HeLa DAN WiDr**

**OLEH**

**ARINA NISYYA NADHIRA**

**K 100 150 149**

**Telah dipertahankan di depan Dewan Penguji  
Fakultas Farmasi  
Universitas Muhammadiyah Surakarta  
Pada hari Rabu, 23 Januari 2019  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat**

**Dewan Penguji:**

- 1. Peni Indrayudha, Ph.D., Apt.**  
**(Ketua Dewan Penguji)**
- 2. Dr. Muhtadi, M.Si.**  
**(Anggota I Dewan Penguji)**
- 3. Ratna Yuliani, S.Si., M.Biotech.St.**  
**(Anggota II Dewan Penguji)**

(.....)  
(.....)  
(.....)

**Dekan,**



**Azis Saifuddin, Ph.D., Apt.**

**NIK. 956**

## **PERNYATAAN**

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam naskah publikasi skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali secara tertulis diacu dalam naskah dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kelak terbukti ada ketidakbenaran dalam pernyataan saya di atas, maka akan saya pertanggungjawabkan sepenuhnya.

**Surakarta, 23 Januari 2019**

Penulis



**ARINA NISYIA NADHIRA**

**K 100 150 149**

# **AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK METANOL DAUN AFRIKA (*Vernonia amygdalina* Delile) TERHADAP SEL HeLa DAN WiDr**

## **Abstrak**

Tanaman Afrika (*Vernonia amygdalina* Delile) merupakan tanaman obat yang diklaim memiliki aktivitas fitoterapi seperti antikanker, antibakteri, antihepatotoksik, antioksidan, modulasi serum lipid, dan fungitoksik. Aktivitas antikanker ekstrak daun Afrika sudah diteliti pada sel kanker MCF-7, sel kanker nasofaring, sel kanker prostat, sel HeLa dan sel WiDr. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas sitotoksik ekstrak metanol daun Afrika terhadap sel HeLa dan sel WiDr. Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi selama lima hari dengan pelarut metanol. Skrining fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa yang terkandung di dalam ekstrak metanol daun Afrika. Uji sitotoksik dilakukan menggunakan metode MTT. Ekstrak metanol daun Afrika memiliki nilai  $IC_{50}$  sebesar 174,25  $\mu\text{g/mL}$  pada sel HeLa dan 247,91  $\mu\text{g/mL}$  pada sel WiDr dan mengandung senyawa metabolit sekunder golongan flavonoid, saponin, seskuiterpen dan steroid. Ekstrak metanol daun Afrika tidak memiliki aktivitas sitotoksik yang poten untuk dikembangkan sebagai agen antikanker.

**Kata Kunci:** *Vernonia amygdalina*, sitotoksik, uji MTT, HeLa, WiDr.

## **Abstract**

African plants (*Vernonia amygdalina* Delile) are medicinal plants that claimed to have phytotherapy activities such as anticancer, antibacterial, antihepatotoxic, antioxidants, serum lipid modulation, and fungitoxic. Anticancer activity of African leaves extract have been widely studied against MCF-7 cells, nasopharing cancer cells, prostate cancer cells, HeLa cells and WiDr cells. The aim of this study was to determine the cytotoxic activity of methanolic extract of African leaves (*Vernonia amygdalina* Delile) on HeLa and WiDr cells. Extraction of African leaves was done by maceration method for five days using methanol as the solvent. Phytochemical screening was carried out to identify the compounds in methanolic extract of African leaves. Cytotoxic test was carried out using MTT assay method. The methanolic extract of African leaves has  $IC_{50}$  values of 174.25  $\mu\text{g/mL}$  against HeLa cells and 247.91  $\mu\text{g/mL}$  against WiDr cells and it contains secondary metabolites of flavonoids, saponins, sesquiterpenes and steroids. Methanolic extract of African leaves does not have potential to be developed as an anticancer agent.

**Keywords:** *Vernonia amygdalina*, cytotoxic, MTT assay, HeLa, WiDr.

## 1. PENDAHULUAN

Kanker merupakan salah satu penyakit yang sering menyebabkan mortalitas. Berdasarkan data dari Badan Organisasi Kesehatan Dunia (WHO), terjadi 9,6 juta kasus kematian kanker pada tahun 2018. Kanker kolon berada di urutan kedua penyebab kematian kanker di dunia dengan jumlah 880.792 kematian. Kanker serviks juga merupakan penyebab kematian pada urutan kesembilan dengan jumlah 311,365 kematian (IARC, 2018).

Sel HeLa merupakan sel kanker leher rahim yang muncul sebagai akibat dari infeksi Human Papillomavirus (HPV 18) yang mampu menginduksi serangkaian proses yang akhirnya menimbulkan sifat kanker, tidak secara langsung membentuk tumor (Goodwin and DiMaio, 2000). Sel WiDr adalah sel kanker yang muncul pada usus besar atau kolon. Kanker kolon merupakan hasil dari proses inaktivasi mutasi tumor *suppressor gen* yang akan menargetkan sel normal untuk berubah menjadi adenoma kecil, menjadi lebih besar, hingga akhirnya menjadi karsinoma (Chesnokova *et al.*, 2016).

Terapi kanker dengan obat-obat sintetis terkadang tidak adekuat dan menimbulkan efek samping yang cukup serius (Yedjou *et al.*, 2013). Obat herbal atau tradisional memiliki keamanan cukup tinggi dibandingkan dengan obat modern dan efek samping relatif lebih sedikit (Sari, 2006). Daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Delile) merupakan keluarga Compositae, yang dapat digunakan sebagai agen antikanker aktif dan dapat menurunkan viabilitas beberapa sel kanker. Metabolit sekunder yang bersifat sitotoksik dan aktif dalam menghambat siklus sel pada fase S yaitu vernolida, yang merupakan senyawa golongan seskuiterpena lakton (Sinisi *et al.*, 2015). Ekstrak kloroform daun Afrika mampu menunjukkan aktivitas sitotoksiknya terhadap sel karsinoma nasofaring dan senyawa yang bersifat sitotoksik pada ekstrak tersebut adalah vernodalin dan vernomigdin yang memiliki nilai  $EC_{50}$  masing-masing 1,8  $\mu\text{g/mL}$  dan 1,5  $\mu\text{g/mL}$  (Kupchan *et al.*, 1969). Ekstrak daun Afrika lain yang memiliki aktivitas sitotoksik yaitu ekstrak etanol daun Afrika dengan nilai  $IC_{50}$  61,357  $\mu\text{g/mL}$  terhadap sel HeLa (Hartaty, 2015), ekstrak ekstrak etil asetat daun Afrika dengan nilai  $IC_{50}$  9,086  $\mu\text{g/mL}$  terhadap sel WiDr (Bestari *et al.*, 2018), dan ekstrak metanol daun Afrika dengan nilai  $IC_{50}$  196,9  $\mu\text{g/mL}$  terhadap sel kanker prostat PC-3 (Johnson *et al.*, 2017). Berdasarkan data tersebut, penelitian dilakukan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik ekstrak metanol daun Afrika terhadap sel HeLa dan sel WiDr dan kandungan senyawa di dalam ekstrak metanol daun Afrika.

## **2. METODE**

### **2.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah alat gelas, almari pengering, neraca analitik (Ohaus), blender, bejana maserasi, *vacuum compressor* (Vacuubrand), corong Buchner, *rotary evaporator* (Stuart), *waterbath* (Memmert), inkubator CO<sub>2</sub> (Binder), mikropipet, vorteks (Maxi Mix II), sonikator (Branson), *Laminar Air Flow* (ESCO), mikroskop (Olympus), hemositometer, tabung reaksi, rak tabung, *coulter counter*, dan *ELISA reader* (Biotek ELx800).

### **2.2 Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Delile) yang diperoleh dari Desa Kemetul, Kecamatan Susukan, Kabupaten Semarang, metanol, sel HeLa, sel WiDr, ammonia (NH<sub>3</sub>) 25%, kloroform (CHCl<sub>3</sub>), pereaksi Dragendorff, pereaksi Mayer, petroleum eter, serbuk vanilin, asam asetat anhidrat ((CH<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O), asam sulfat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pekat, serbuk magnesium, asam klorida (HCl) pekat, HCl 1%, amil alkohol, feri (III) klorida (FeCl<sub>3</sub>) 1%, NaOH 1 N, Media Kultur *Roswell Park Memorial Institute* (MK RPMI), akuades, NaHCO<sub>3</sub>, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO), 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT), reagen *stopper Sodium Dodecyl Sulfate* 10% (SDS), *Fetal Bovine Serum* (FBS), tripsin-EDTA, alumunium foil, tabung *microcentrifuge*, 96-well plate, *blue tips*, *yellow tips*, *white tips*, kertas saring, *conical tube*, *culture dish*, doksorubisin, paklitaksel, dan penisilin-streptomisin.

### **2.3 Ekstraksi Daun Afrika**

Ekstrak daun Afrika diperoleh dengan cara maserasi. Daun Afrika dikeringkan menjadi simplisia dengan almari pengering, kemudian dihaluskan dengan blender. Simplisia halus daun Afrika sebanyak 200 gram dimaserasi dengan pelarut metanol dengan perbandingan 1:5 (1000 mL). Maserasi dilakukan selama 5 hari. Hasil maserasi kemudian disaring dengan corong Buchner untuk memisahkan maserat dan ampasnya. Maserat dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* dan diletakkan di *waterbath* hingga menjadi ekstrak kental.

### **2.4 Identifikasi Senyawa dengan Skrining Fitokimia**

Identifikasi senyawa dilakukan dengan metode skrining fitokimia (metode tabung) untuk mengetahui senyawa golongan alkaloid, flavonoid, saponin, seskuiterpen, steroid, dan tanin.

#### **2.4.1 Identifikasi Golongan Alkaloid**

Ekstrak daun Afrika 40 mg ditambahkan ammonia 25% sebanyak 5 mL, digerus di dalam mortir, ditambahkan 20 mL kloroform dan digerus dengan kuat. Filtrat disaring (larutan A), diambil sebanyak 10 mL dicampur dengan 10 mL larutan HCl 1:10, dikocok dalam tabung reaksi, dan larutan bagian atasnya dianggap sebagai larutan B. Larutan A diambil dengan pipet, diteteskan pada

kertas saring dan disemprot pereaksi Dragendorff. Warna merah atau jingga menunjukkan positif senyawa alkaloid. Larutan B dibagi kedalam dua tabung reaksi, ditambahkan Dragendorff dan Mayer pada masing-masing tabung. Endapan merah bata pada pereaksi Dragendorff dan endapan putih pada pereaksi Mayer menunjukkan adanya senyawa alkaloid (Djamil and Anelia, 2009).

#### **2.4.2 Identifikasi Golongan Flavonoid**

Ekstrak daun Afrika 40 mg ditambahkan 100 mL air panas dan dididihkan selama 5 menit. Larutan disaring dan filtrat digunakan sebagai larutan percobaan. Larutan percobaan diambil sebanyak 5 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Serbuk atau lempeng magnesium ditambahkan ke dalam larutan percobaan secukupnya, ditambahkan 1 mL HCl pekat, 5 mL amil alkohol, dikocok dengan kuat dan dibiarkan hingga memisah. Warna yang terbentuk pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya senyawa flavonoid di dalam ekstrak (Djamil and Anelia, 2009).

#### **2.4.3 Identifikasi Golongan Saponin**

Larutan percobaan yang dibuat pada identifikasi flavonoid diambil sebanyak 10 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Larutan percobaan dikocok kuat selama 10 detik secara vertikal dan dibiarkan selama 10 menit. Terbentuknya busa yang stabil bahkan setelah ditambahkan 1 tetes asam klorida 1% (encer) menunjukkan senyawa golongan saponin (Djamil and Anelia, 2009).

#### **2.4.4 Identifikasi Golongan Sesquiterpen**

Ekstrak daun Afrika dilarutkan dalam petroleum eter dan diuapkan hingga kering. Setelah pekat, ditambah pereaksi vanillin 10% dalam asam sulfat. Adanya senyawa golongan sesquiterpen ditunjukkan dengan warna biru yang muncul pada larutan (Farnsworth, 1966).

#### **2.4.5 Identifikasi Golongan Steroid**

Ekstrak daun Afrika dilarutkan dengan 0,5 mL kloroform, dan ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrida dan 0,5 mL - 1 mL asam sulfat pekat (pereaksi Liebermann-Buchard) dari dinding tabung. Senyawa steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru hingga hijau (Autherhoff and Kovar, 1987).

#### **2.4.6 Identifikasi Golongan Tanin**

Ekstrak daun Afrika sebanyak 40 mg, ditambahkan 100 mL air dan dididihkan selama 15 menit. Setelah dingin, filtrat disaring dan ditambahkan larutan  $\text{FeCl}_3$  1%. Warna biru tua atau hijau kehitaman yang terbentuk menunjukkan senyawa golongan tanin (Djamil and Anelia, 2009).

### **2.5 Uji Sitotoksik**

Uji sitotoksik dilakukan dengan metode MTT *assay*. Sel HeLa dan sel WiDr dengan kepadatan sel masing-masing  $1 \times 10^4$  sel/sumuran ditransfer ke dalam sumuran 96 *well-plate*, masing-masing 100  $\mu\text{L}$  dan disisakan tiga sumuran kosong untuk kontrol media. Sel diinkubasi hingga konfluen.



Ekstrak daun Afrika untuk uji sitotoksik dibuat dengan lima seri konsentrasi berbeda yaitu 31,25 µg/mL, 62,5 µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL, dan 500 µg/mL. Kontrol positif yang digunakan untuk sel HeLa dan sel WiDr yaitu doksorubisin dengan konsentrasi 1,5625 µg/mL, 3,125 µg/mL, 6,25 µg/mL, 12,5 µg/mL, dan 25 µg/mL. Kontrol pelarut DMSO digunakan pada sel HeLa dan WiDr dengan konsentrasi 0,75%. RPMI digunakan sebagai kontrol media.

Sel yang telah konfluen di 96 *well plate* dikeluarkan dari inkubator dan media sel dibuang. Masing-masing konsentrasi ekstrak, kontrol positif, kontrol pelarut, dan kontrol media dimasukkan ke dalam sumuran sebanyak 100 µL, kemudian *plate* diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> dengan suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam masa inkubasi, media sel dibuang, kemudian ditambahkan reagen MTT dengan konsentrasi 0,05% sebanyak 100 µL tiap sumuran. *Plate* diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> selama 2 jam. Kondisi sel diperiksa dengan mikroskop. *Stopper* SDS 10% dalam 0,01 N HCl ditambahkan sebanyak 100 µL ketika formazan telah jelas terbentuk. *Plate* dibungkus dengan aluminium foil dan diinkubasi di tempat gelap pada suhu kamar selama satu malam. Aluminium foil pembungkus dilepas, tutup *plate* dibuka, dan *plate* dimasukkan ke dalam ELISA *reader*. Absorbansi masing-masing sumuran dibaca dengan ELISA *reader* dengan λ 550 nm. ELISA *reader* dimatikan, kertas hasil ELISA disimpan dan dibuat grafik absorbansi setelah dikurangi kontrol media vs konsentrasi (*Cancer Chemoprevention Research Center*, 2014).

## **2.6 Analisis Hasil**

### **2.6.1 Analisis Hasil Skrining Fitokimia**

Hasil uji skrining fitokimia digunakan untuk mengidentifikasi senyawa yang terkandung di dalam ekstrak metanol daun Afrika. Analisis hasil dilakukan dengan mengamati pembentukan endapan, busa stabil, atau perubahan warna pada uji dengan pereaksi yang sesuai. Adanya senyawa metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, saponin, seskuiterpen, steroid, dan tanin di dalam ekstrak metanol daun Afrika ditunjukkan dengan adanya perubahan ekstrak yang telah dilarutkan dengan pelarut atau reagen yang sesuai ketika diberikan pereaksi tertentu.

### **2.6.2 Analisis Hasil Uji Sitotoksik**

Data absorbansi yang diperoleh dengan ELISA *reader* dimasukkan kedalam rumus % sel hidup untuk menghitung viabilitas sel atau presentase jumlah sel hidup.

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol pelarut} - \text{Absorbansi kontrol media}} \times 100\% \quad (1)$$

Aktivitas sitotoksik ekstrak metanol daun Afrika diketahui dari besaran nilai IC<sub>50</sub> yang dihasilkan. IC<sub>50</sub> merupakan konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% populasi sel hidup. Menurut US National Cancer Institute (NCI), ekstrak kasar yang memiliki aktivitas sitotoksik poten

yaitu ekstrak dengan nilai  $IC_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$  (Boik, 2011). Nilai  $IC_{50}$  dapat diperoleh dari perhitungan regresi linier grafik log konsentrasi vs persentase sel hidup (*Cancer Chemoprevention Research Center*, 2014).

### **3. HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **3.1 Ekstraksi Daun Afrika**

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol. Metanol merupakan pelarut yang dapat menarik komponen bioaktif polar, semi polar, dan non polar sehingga ekstraksi dengan pelarut metanol dapat menghasilkan rendemen yang tinggi. Nilai rendemen menunjukkan kandungan komponen bioaktif dalam ekstrak (Nurhayati *et al.*, 2009).

Simplisia halus daun Afrika sebanyak 200,02 gram menghasilkan ekstrak metanol sebanyak 13,19 gram dengan rendemen sebesar 6,59%. Ekstrak daun Afrika yang dihasilkan berwarna hijau pekat dengan konsistensi sangat kental. Ekstrak etanol daun Afrika memiliki rendemen sebesar 9,45% (Hartaty, 2015). Rendemen yang dihasilkan pada ekstrak metanol daun Afrika lebih kecil dibandingkan ekstrak etanol daun Afrika. Hal ini menunjukkan senyawa bioaktif yang terdapat di dalam ekstrak metanol daun Afrika lebih sedikit dibandingkan senyawa bioaktif yang terdapat di dalam ekstrak etanol daun Afrika.

Rendemen yang dihasilkan dari suatu ekstrak dapat bervariasi. Variasi rendemen dapat terjadi karena beberapa hal antara lain metode ekstraksi, ukuran partikel sampel, kondisi penyimpanan, lama penyimpanan, lama waktu ekstraksi, perbandingan simplisia terhadap pelarut yang digunakan dan jenis pelarut yang digunakan. Metanol merupakan bentuk alkohol paling sederhana dengan rumus kimia  $\text{CH}_3\text{OH}$ . Metanol mengandung gugus hidroksil yang bersifat polar dan karbon yang bersifat nonpolar yang menyebabkan gugus polar yang lebih kuat dibandingkan gugus nonpolar (Ukhty, 2011). Kandungan gugus dalam metanol menyebabkan metanol mampu mengekstrak komponen bioaktif polar lebih banyak dan sedikit komponen bioaktif nonpolar.

#### **3.2 Identifikasi Senyawa dengan Metode Skrining Fitokimia**

Identifikasi senyawa yang terdapat di dalam ekstrak metanol daun Afrika dilakukan dengan uji skrining fitokimia. Senyawa yang diidentifikasi yaitu alkaloid, flavonoid, saponin, seskuiterpen, steroid, dan tanin. Adanya senyawa alkaloid di dalam ekstrak ditunjukkan dengan pembentukan endapan putih dan merah karena penambahan pereaksi Dragendorff dan Mayer, senyawa flavonoid ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna lapisan amil alkohol ketika dilakukan pengocokan, saponin ditunjukkan dengan terbentuknya busa karena penggojokan kuat dan busa yang terbentuk

stabil ketika ditetesi HCl 1%, seskuiterpen ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru dengan pereaksi vanillin 10% dalam HCl, steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru hingga hijau ketika direaksikan dengan pereaksi Liebermann-Buchard, dan tanin ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tua atau hijau kehitaman dengan pereaksi FeCl<sub>3</sub> 1% (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil uji skrining fitokimia pada ekstrak metanol daun Afrika

Uji Fitokimia	Pereaksi	Hasil*	Keterangan
Alkaloid	Mayer	-	Terbentuk endapan merah bata
	Dragendorff	-	Terbentuk endapan putih
Flavonoid	Amil alkohol	+	Terbentuk warna hijau pada lapisan amil alkohol
Saponin	Akuades	+	Terbentuk busa dengan penggojokan kuat dan busa yang terbentuk stabil ketika ditetesi HCl 1%
Seskuiterpen	Vanilin 10%	+	Terbentuk larutan berwarna biru tua
Steroid	Liebermann-Buchard	+	Terbentuk larutan berwarna biru tua
Tanin	FeCl <sub>3</sub> 1%	-	Tidak terbentuk warna biru tua atau hijau kehitaman

\*Keterangan: + = terdapat senyawa yang diidentifikasi; - = tidak terdapat senyawa yang diidentifikasi

Kandungan senyawa di dalam ekstrak metanol daun Afrika yang diperoleh dari tanaman yang berbeda cukup bervariasi. Variasi kandungan senyawa di dalam ekstrak metanol daun Afrika dapat terjadi karena lokasi geografis tumbuhnya tanaman afrika, waktu panen, dan kondisi cuaca pada saat panen daun Afrika (Adebayo *et al.*, 2014). Ekstrak metanol daun Afrika dalam penelitian ini mengandung senyawa golongan saponin, seskuiterpen, steroid, dan flavonoid. Menurut penelitian Adebayo *et al.* (2014), kandungan senyawa tertinggi di dalam ekstrak metanol daun Afrika yaitu saponin (14,23%), kemudian diikuti dengan senyawa golongan terpen (10,20%), senyawa golongan fenolik (8,24%), senyawa alkaloid (7,49%), tanin (5,4%), dan flavonoid (2,15%). Senyawa yang tidak terdapat pada ekstrak metanol daun Afrika dalam penelitian ini yaitu senyawa golongan fenolik, alkaloid, dan tanin. Daun Afrika yang digunakan pada penelitian ini berasal dari Desa Kemetul, Kecamatan Susukan, Kabupaten Semarang, dipanen pada bulan Juli 2018. Daun Afrika pada penelitian Adebayo *et al.* (2014) diperoleh dari Navrongo daerah tinggi bagian timur Ghana dan dipanen pada bulan November 2011. Berdasarkan perbandingan dua ekstrak metanol daun Afrika yang diperoleh dari tumbuhan afrika berbeda, variasi kandungan senyawa metabolit sekunder pada ekstrak metanol daun Afrika dapat terjadi karena perbedaan letak geografis dan waktu panen daun Afrika, sehingga memungkinkan ekstrak metanol daun Afrika memiliki perbedaan kandungan senyawa meskipun pelarut yang digunakan untuk ekstraksi sama.

Tabel 2. Kandungan ekstrak daun Afrika dengan pelarut berbeda pada penelitian sebelumnya

Kandungan Senyawa	Ekstrak Daun Afrika ( <i>Vernonia amygdalina</i> Delile)			
	Etanol (Hartaty, 2015)	Etanol (Bestari <i>et al.</i> , 2018)	Etil asetat (Bestari <i>et al.</i> , 2018)	Metanol (Adebayo <i>et al.</i> , 2014)
Alkaloid	-	-	-	+
Flavonoid	+	+	+	+
Glikosida	+	+	+	+
Saponin	+	+	+	+
Terpenoid/ Seskuiterpen	+	+	+	+
Steroid	+	+	+	+
Tanin	+	+	-	+
Fenolik	tidak diuji	tidak diuji	tidak diuji	+

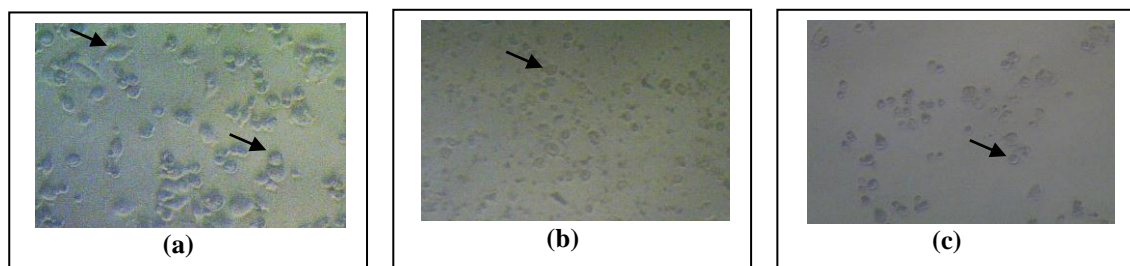
Beberapa ekstrak daun Afrika dengan pelarut berbeda menunjukkan kandungan senyawa yang berbeda. Kandungan senyawa pada ekstrak yang berbeda dapat terjadi salah satunya karena perbedaan pelarut yang digunakan untuk ekstraksi. Polaritas dan gugus fungsi dalam struktur kimia pelarut juga berpengaruh terhadap golongan senyawa yang dapat diekstraksi. Kandungan senyawa yang dapat diekstraksi oleh pelarut juga dapat mempengaruhi aktivitas sitotoksik ekstrak daun Afrika yang dihasilkan.

### 3.3 Uji Sitotoksik

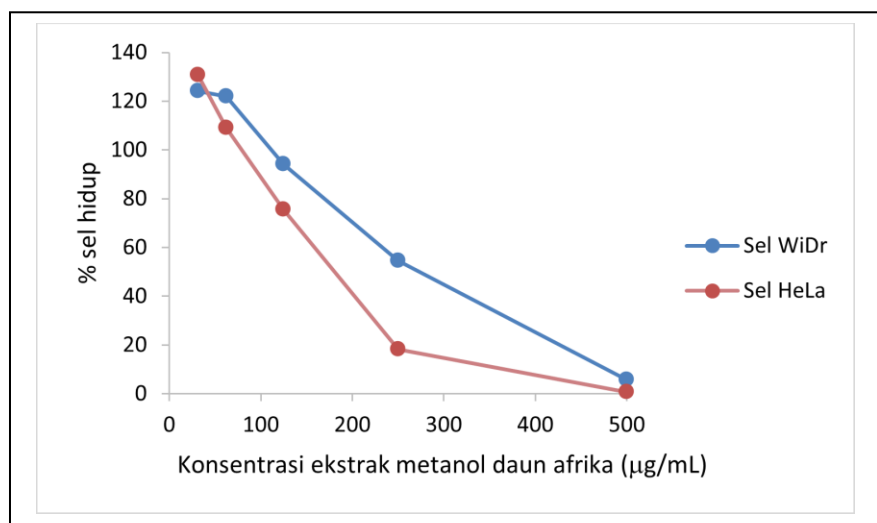
Metode yang digunakan untuk menguji aktivitas sitotoksik ekstrak metanol daun Afrika yaitu metode MTT. Prinsip dari metode uji MTT adalah reduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida) oleh sistem reduktase. Enzim mitokondria pada sel hidup yang aktif akan memetabolisme garam tetrazolium dan menyebabkan tetrazolium berubah menjadi kristal formazan yang berwarna ungu dan tidak larut air. Penambahan reagen *stopper* akan melarutkan kristal formazan yang berwarna ungu. Absorbansi diukur menggunakan *ELISA reader*. Intensitas warna ungu yang terbentuk pada uji MTT proporsional dengan banyaknya sel hidup (Cancer Chemoprevention Research Center, 2014).

Uji aktivitas sitotoksik pertama dilakukan pada sel HeLa dengan menggunakan doksorubisin sebagai kontrol positif. Hasil uji aktivitas sitotoksik ekstrak metanol daun Afrika terhadap sel HeLa menunjukkan adanya perubahan morfologi sel sebelum dan sesudah diberikan perlakuan uji (Gambar 1). Morfologi sel HeLa yang normal memiliki yaitu poligonal atau bulat dan memiliki sitoplasma cukup luas (Hutomo *et al.*, 2016), dan bergerombol. Setelah diberikan perlakuan

menggunakan ekstrak metanol daun Afrika sel mengalami pengkerutan dan kehilangan sitoplasma sehingga ukurannya menjadi lebih kecil dan berwarna gelap. Sel HeLa yang diberikan perlakuan menggunakan kontrol positif doksorubisin juga menunjukkan perubahan morfologi yang sama seperti pada perlakuan ekstrak metanol daun Afrika. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak metanol daun Afrika dan doksorubisin yang diberikan pada sel HeLa, semakin sedikit jumlah sel HeLa yang hidup (Gambar 2). Sel HeLa yang masih hidup tidak mengalami pengkerutan. Sel tersebut akan membentuk kristal formazan berwarna ungu dan tidak larut air ketika diberi reagen MTT. Kristal formazan akan larut setelah ditambah reagen *stopper* yang bersifat detergenik. Kristal yang terlarut menghasilkan warna ungu pada sumuran 96 *well plate* yang digunakan untuk uji sitotoksik terhadap sel HeLa.



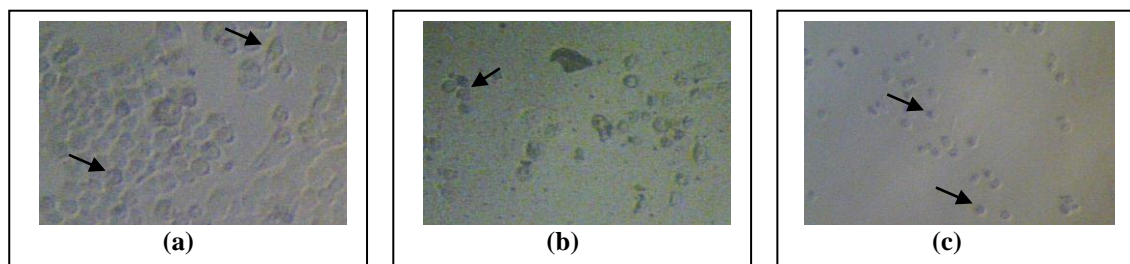
Gambar 1. Morfologi sel HeLa sebelum dan sesudah diberikan perlakuan uji. Berdasarkan pengamatan dengan mikroskop, sel HeLa yang normal (a) memiliki bentuk poligonal atau bulat; sel HeLa yang sudah diberi ekstrak metanol daun Afrika dengan konsentrasi 500  $\mu\text{g/mL}$  (b) dan doksorubisin dengan konsentrasi 25  $\mu\text{g/mL}$  (c) mengalami pengkerutan ukuran dan kehilangan sitoplasma sehingga ukuran sel menjadi lebih kecil dan warna sel berubah menjadi gelap.



Gambar 2. Hubungan konsentrasi ekstrak metanol daun Afrika dengan % sel hidup sel HeLa dan sel WiDr.

Potensi aktivitas sitotoksik ekstrak metanol daun Afrika dan kontrol positif doksorubisin terhadap sel HeLa dapat diketahui dari nilai  $IC_{50}$ . Ekstrak metanol daun Afrika menghasilkan nilai  $IC_{50}$  174,25  $\mu\text{g/mL}$  terhadap sel HeLa. Doksorubisin menghasilkan nilai  $IC_{50}$  5,91  $\mu\text{g/mL}$  terhadap sel HeLa. Berdasarkan nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh pada ekstrak metanol daun Afrika dan doksorubisin, aktivitas sitotoksik ekstrak metanol daun Afrika lebih rendah dibandingkan aktivitas sitotoksik doksorubisin.

Uji aktivitas sitotoksik kedua dilakukan pada sel WiDr. Doksorubisin digunakan sebagai kontrol positif pada uji sitotoksik terhadap sel WiDr. Sel WiDr normal memiliki morfologi khas poligonal dan membentuk kelompok yang rapat (Gander *et al.*, 1996). Morfologi sel WiDr normal mengalami perubahan ketika diberi ekstrak metanol daun Afrika dan doksorubisin (Gambar 3). Sel WiDr akan menjadi lebih bulat, berukuran lebih kecil, dan berwarna gelap. Sel yang tidak mengalami perubahan morfologi menandakan bahwa sel tersebut masih hidup dan dapat membentuk kristal formazan pada pemberian reagen MTT. Sel yang mengalami perubahan morfologi semakin banyak jika konsentrasi ekstrak metanol daun Afrika dan doksorubisin yang diberikan pada uji sitotoksik semakin tinggi. Jumlah sel hidup semakin berkurang ketika konsentrasi ekstrak dan doksorubisin semakin tinggi (Gambar 2).



Gambar 3. Morfologi sel WiDr sebelum dan sesudah diberikan perlakuan uji. Berdasarkan pengamatan dengan mikroskop, sel WiDr yang normal (a) memiliki bentuk poligonal; sel WiDr yang sudah diberi ekstrak metanol daun Afrika dengan konsentrasi 500  $\mu\text{g/mL}$  (b) dan doksorubisin dengan konsentrasi 25  $\mu\text{g/mL}$  (c) berbentuk bulat, berukuran lebih kecil, dan berwarna gelap.

Aktivitas sitotoksik ekstrak metanol daun Afrika dan doksorubisin diketahui dari nilai  $IC_{50}$ . Nilai  $IC_{50}$  ekstrak metanol daun Afrika terhadap sel WiDr yaitu 247,91  $\mu\text{g/mL}$ .  $IC_{50}$  doksorubisin tidak dapat dihitung karena jumlah % sel hidup yang dihasilkan dari lima konsentrasi doksorubisin kurang dari 50% (Tabel 2). Doksorubisin dengan konsentrasi 1,5626  $\mu\text{g/mL}$  memiliki % sel hidup sebanyak 38,436% yang berarti sekitar 60% sel WiDr sudah dihambat aktivitasnya oleh doksorubisin.  $IC_{50}$  merupakan konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% populasi sel hidup, sehingga dapat diperkirakan nilai  $IC_{50}$  doksorubisin terhadap sel WiDr yaitu <1,5625  $\mu\text{g/mL}$ . Menurut penelitian Wulandari *et al.* (2018), doksorubisin memiliki nilai  $IC_{50}$  1,6  $\mu\text{M}$  terhadap sel

WiDr. Nilai  $IC_{50}$  yang semakin rendah menunjukkan aktivitas sitotoksik yang semakin tinggi. Berdasarkan nilai  $IC_{50}$  doksorubisin pada penelitian Wulandari *et al.* (2018) dan viabilitas sel pada perlakuan uji doksorubisin (Tabel 2), dapat disimpulkan bahwa doksorubisin memiliki aktivitas sitotoksik yang tinggi terhadap sel WiDr. Aktivitas sitotoksik ekstrak metanol daun Afrika terhadap sel WiDr lebih rendah dibandingkan dengan aktivitas sitotoksik doksorubisin.

Tabel 3. Viabilitas sel WiDr pada perlakuan uji doksorubisin

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Sel Hidup
1,562	38,436
3,125	18,436
6,250	13,408
12,500	12,961
25,000	11,955

Tabel 4. Nilai  $IC_{50}$  ekstrak daun Afrika penelitian sebelumnya

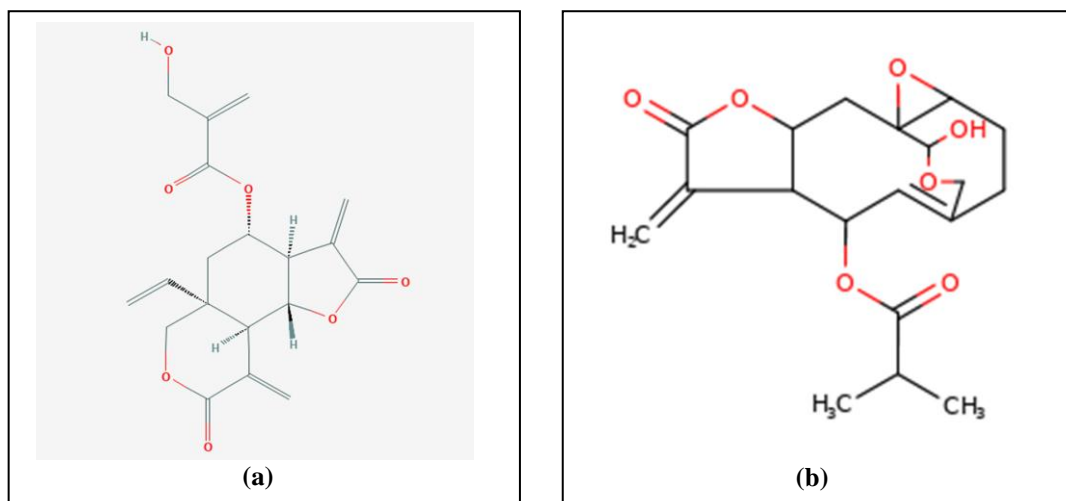
Pelarut	Sel Kanker	$IC_{50}$
Etanol (Hartaty, 2015)	Sel HeLa	61,357 $\mu\text{g/mL}$
Etil asetat (Bestari <i>et al.</i> , 2018)	Sel WiDr	9,086 $\mu\text{g/mL}$
Metanol (Johnson <i>et al.</i> , 2017)	Sel kanker prostat (PC-3)	196,9 $\mu\text{g/mL}$

Aktivitas sitotoksik dari beberapa ekstrak daun Afrika memiliki potensi berbeda pada sel yang berbeda (Tabel 3). Ekstrak metanol daun Afrika menunjukkan potensi aktivitas sitotoksik lebih rendah terhadap sel HeLa dengan nilai  $IC_{50}$  174,25  $\mu\text{g/mL}$  jika dibandingkan dengan ekstrak etanol daun Afrika dan lebih rendah terhadap sel WiDr dengan nilai  $IC_{50}$  247,91  $\mu\text{g/mL}$  jika dibandingkan dengan ekstrak etil asetat daun Afrika. Perbedaan aktivitas ekstrak daun Afrika dapat terjadi karena pelarut yang digunakan untuk ekstraksi. Berdasarkan NCI, nilai  $IC_{50}$   $<20$   $\mu\text{g/mL}$  menunjukkan bahwa aktivitas sitotoksik suatu ekstrak adalah poten. Ekstrak metanol daun Afrika memiliki  $IC_{50}$   $>20$   $\mu\text{g/mL}$  yang berarti tidak memiliki potensi aktivitas sitotoksik untuk dikembangkan menjadi agen anti kanker.

Senyawa yang memiliki aktivitas sitotoksik pada ekstrak daun Afrika yaitu vernodalin dan vernomigdin (Kupchan *et al.*, 1969). Vernodalin (Gambar 4a) dan vernomigdin (Gambar 4b) merupakan senyawa metabolit sekunder golongan seskuiterpen lakton yang termasuk dalam golongan terpenoid. Menurut Matejic *et al.*, (2010), seskuiterpen merupakan senyawa terpenoid yang

memiliki jumlah atom karbon C 15. Seskuiterpen lakton terbentuk dari tiga unit isopren C5. Salah satu gugus metanol yang dimiliki seskuiterpen sebagai bagian dari unit isopren akan mengalami oksidasi menjadi lakton (Marin, 2003). Seskuiterpen dapat diisolasi dari berbagai organ tumbuhan dan lebih sering ditemukan pada daun dan trikoma glandular pada daun.

Menurut Kupchan *et al.* (1969), vernodalin dan vernomigdin dapat diekstraksi dengan fraksinasi. Simplisia daun Afrika diekstraksi dengan pelarut kloroform, dievaporasi dan dilakukan partisi dengan 10% metanol aqueous dan petroleum eter. Fraksi metanol aqueous dievaporasi, kemudian dilakukan kromatografi untuk mendapatkan fraksi senyawa yang memiliki aktivitas sitotoksik, dan dilakukan kromatografi ulang pada fraksi tersebut untuk mendapatkan senyawa vernolida, vernomigdin, dan vernodalin. Vernodalin dan vernomigdin hanya memiliki satu gugus hidroksil dan memiliki rantai siklik dan oksigen sehingga vernodalin dan vernomigdin memiliki kepolaran rendah dan sukar larut dalam pelarut metanol yang bersifat polar.



Gambar 4. Struktur senyawa vernodalin (a) dan vernomigdin (b).

Aktivitas sitotoksik ekstrak metanol daun Afrika kurang aktif dimungkinkan karena adanya pengaruh klorofil dari daun. Pada penelitian ini, klorofil tidak dipisahkan sebelum daun diekstraksi sehingga dapat mempengaruhi nilai  $IC_{50}$  ekstrak metanol daun Afrika. Menurut Andarwulan and Faradilla (2012), klorofil dapat dipisahkan dengan paparan panas seperti direbus. Protein yang melindungi klorofil dapat terdenaturasi ketika daun terkena paparan panas seperti direbus sehingga klorofil yang semula berikatan dengan molekul protein dapat menjadi bentuk bebas.  $IC_{50}$  ekstrak metanol daun Afrika  $>20 \mu\text{g/mL}$  yang berarti ekstrak metanol daun Afrika tidak memiliki potensi aktivitas sitotoksik untuk dikembangkan menjadi agen anti kanker.



#### 4. PENUTUP

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak metanol daun Afrika tidak memiliki potensi aktivitas sitotoksik untuk dikembangkan sebagai agen antikanker. Nilai  $IC_{50}$  ekstrak metanol daun Afrika pada sel HeLa sebesar 174,25  $\mu\text{g/mL}$  dan pada sel WiDr sebesar 247,91  $\mu\text{g/mL}$ . Ekstrak metanol daun Afrika mengandung senyawa golongan flavonoid, saponin, seskuiterpen, dan steroid.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Adebayo O.L., James A., Kasim S.B. and Jagri O.P., 2014, Leaf Extracts of *Vernonia amygdalina* Del. from Northern Ghana Contain Bioactive Agents that Inhibit the Growth of Some Beta-lactamase Producing Bacteria in vitro, *British Journal of Pharmaceutical Research*, 4 (2), 192–202.
- Andarwulan N. and Faradilla R.F., 2012, Hijau Klorofil, Dalam *Pewarna Alami Untuk Pangan*, SEAFast Center Institut Pertanian Bogor, Bogor, pp. 58–69.
- Auterhoff H. and Kovar K.A., 1987, *Identifikasi Obat*, ITB, Bandung, cit in Muti'ah R., Hayati E.K. and Triastutik Y., 2013, Pemisahan dan Identifikasi Ekstrak Kasar Seskuiterpen Daun Bunga Matahari (*Helianthus annuus* L.) dengan Kromatografi Lapis Tipis, *Alchemy*, 2 (3), 190–194.
- Bestari R., Ichwan M., Mustofa and Satria D., 2018, Anticancer Activity of *Vernonia amygdalina* Del. Extract on WiDr Colon Cancer Cell Line, *Advances in Health Sciences Research*, 9, 172–176.
- Boik J., 2001, *Natural Compounds in Cancer Therapy*, Oregon Press, Minnesota, USA, p. 25, cit in Lee C.C. and Houghton P., 2005, Cytotoxicity of Plants from Malaysia and Thailand Used Traditionally to Treat Cancer, *Journal of Ethnopharmacology*, 100 (3), 237–243.
- Cancer Chemoprevention Research Center, 2014, *Protokol Uji Sitotoksik*, Terdapat di: [http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/?page\\_id=240](http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/?page_id=240) [Diakses pada March 24, 2018].
- Chesnokova V., Zonis S., Zhou C., Victoria Recouvreux M., Ben-shlomo A., Araki T., Barrett R., Workman M., Wawrowsky K., Ljubimov V.A., Uhart M. and Melmed S., 2016, Growth Hormone is Permissive for Neoplastic Colon Growth, *PNAS*, 113 (23), E3250–E3259.
- Djamil R. and Anelia T., 2009, Penapisan Fitokimia, Uji BSLT, dan Uji Antioksidan Ekstrak Metanol beberapa Spesies Papilionaceae, *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 7 (2), 65–71.
- Farnsworth N.R., 1966, Biological and Phytochemical Screening of Plants, *Journal of Pharmaceutical Science*, 55 (3), 225–276.
- Gander J.C., Gotzos V., Fellay B. and Schwaller B., 1996, Inhibition of the Proliferative Cycle and Apoptotic Events in WiDr Cells after Down-Regulation of the Calcium-Binding Protein Calretinin Using Antisense Oligodeoxynucleotides, *Experimental Cell Research*, 225 (0191), 399–410.
- Goodwin E.C. and DiMaio D., 2000, Repression of Human Papillomavirus Oncogenes in HeLa Cervical Carcinoma Cells Causes the Orderly Reactivation of Dormant Tumor Suppressor Pathways, *PNAS*, 97 (23), 12513–12518.
- Hartaty, 2015, *Efek Sitotoksik Ekstrak Etanol Daun Afrika (Vernonia amygdalina Del.) Terhadap Sel HeLa dan Vero*, Medan.

- Hutomo S., Susilowati H., Suryanto Y.I. and Kurniawan C., 2016, Perubahan Morfologi Sel HeLa Setelah Paparan Ekstrak Etanolik Curcuma longa, , 2 (1), 1–5.
- IARC, 2018, *Cancer Today*, Terdapat di: [http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2018&mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=5&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=1&include\\_nmsc\\_other=1](http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=5&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1) [Diakses pada 18 Januari 2019] [Diakses pada January 18, 2019].
- Johnson W., Tchounwou P.B. and Yedjou C.G., 2017, Therapeutic Mechanisms of Vernonia amygdalina Delile in the Treatment of Prostate Cancer, *Molecules*, 22 (10), 1594.
- Kupchan S.M., Hemingway R.J., Karim A. and Werner D., 1969, Tumor Inhibitors XLVII Vernodalin and Vernomygdin, Two New Cytotoxic Sesquiterpene Lactones from Vernonia amygdalina Del., *The Journal of Organic Chemistry*, 34 (12), 3908–3911.
- Marin D.P., 2003, *NNK International*, Belgrade, cit in Matejic J., Sarac Z. and Randelovic V., 2010, Pharmacological Activity of Sesquiterpene Lactones, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24 (Sup1), 21–23.
- Matejic J., Sarac Z. and Randelovic V., 2010, Pharmacological Activity of Sesquiterpene Lactones, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24 (Sup1), 21–23.
- Nurhayati T., Aryanti D., Nurjanah, 2009, Kajian Awal Potensi Ekstrak Spons Aebagai Antioksidan, *Jurnal Kelautan Nasional*, 2(2), 43-51. cit in Tarman K., Prestisia H.N., Setyaningsih I., Meydia, Yogiara and Hwang J.-K., 2012, Kandungan Komponen Bioaktif dan Aktivitas Antimikrob Ekstrak Bintang Laut (*Culcita schmideliana*), *JPHPI*, 15 (3), 207–216.
- Sari L.O.R.K., 2006, Pemanfaatan Obat Tradisional dengan Pertimbangan Manfaat dan Keamanannya, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, III (1), 1–7.
- Sinisi A., Millan E., Abay S.M., Habluetzel A., Appendino G., Munoz E. and Tagliatela-Scafati O., 2015, Poly-Electrophilic Sesquiterpene Lactones from Vernonia amygdalina: New Members and Differences in Their Mechanism of Thiol Trapping and in Bioactivity, *Journal of Natural Products*, 78 (7), 1618–1623.
- Ukhty N., 2011, *Kandungan Senyawa Fitokimia Total Fenol dan Aktivitas Antioksidan Lamun (Syringodium isoetifolium)*, Bogor.
- World Health Organization, 2018, *Cancer*, Terdapat di: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> [Diakses pada 18 Maret 2018].
- Wulandari N., Meiftasari A., Fadliyah H. and Jenie R.I., 2018, Red Betel Leaves Methanolic Extract (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) Increases Cytotoxic Effect of Doxorubicin on WiDr Colon Cancer Cells through Apoptosis Induction, *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 9 (1), 1–8.
- Yedjou C.G., Izevbigie E.B. and Tchounwou P.B., 2013, Vernonia amygdalina Induced Growth Arrest and Apoptosis of Breast Cancer (MCF-7) Cells, *Pharmacol Pharm*, 4 (1), 1–14.